

A különböző daganatokban a survivin (az apoptózis inhibitor molekulacsalád tagja) fokozott átíródása arra utal, hogy az apoptózisban résztvevő géneknek jelentős szerepük lehet a tumorok kialakulásában és progressziójában.

Számos tanulmányban közölték, hogy a survivin kifejeződése fontos lehet a méhnyakrák kialakulásában is. Ezt a fokozott expressziót nem csak az invazív rákban, hanem a rákmegelőző állapotokban is tapasztalták.

A humán papillomavírusnak (HPV) régóta nagy jelentőséget tulajdonítanak a cervix carcinoma kifejlődésében. A survivin és a magas kockázatú HPV fertőzés közti esetleges kapcsolatról méhnyakrák esetén is vannak megfigyelések.

A survivin gén promótere normál sejtekben nem aktív, míg a tumorsejtekben intenzíven működik. A promóter számos, a G2/M fázisban expresszáldó gének esetén jellemző sejtciklus függő elemet (CDE, cell cycle dependent element) és sejtciklus homológ régiót (CHR, cell cycle homology region) tartalmaz. Ezen elemek felelősek azért, hogy a survivin gén átíródása sejtciklus függő módon alakuljon. Rákos sejtvonalakban vizsgálva azt találták, hogy a polimorfizmusból adódó survivin promóter variánsok különböznek transzkripció aktivitásukat tekintve. Mivel ez a polimorfizmus a CDE/CHR represszor kötő helyen található, ezért a kapcsolódó elemek kötését befolyásolva hatással lehet a survivin gén sejtciklus függő transzkripciójára, ezáltal szerepe lehet a tumorokban a survivin expresszió szabályozásának felborulásában.

Annak érdekében, hogy megismerjék a survivin polimorfizmus és a HPV asszociált cervix carcinoma kialakulása közti kapcsolatot, a survivin promóter variánsok genotípus megoszlását és az allél frekvencia alakulását méhnyakrákos és Papanicolaou osztályozás szerint P3 diagnózisú betegekben, valamint kontroll populációban tanulmányozták.

A survivin promóter specifikus PCR-t követő RFLP analízissel meg tudták határozni, hogy mintáik melyik nukleotid variáns (G vagy C) tartalmazza a polimorf -31 nukleotid helyen. RFLP mellett mintáinkat SSCP analízissel is megvizsgálták. Az SSCP analízis eredménye teljesen egybevágott az RFLP módszerrel kapottakkal.

A három genotípus variáns egy-egy reprezentatív képviselőjét megszekvenálták, a szekvenciák szintén alátámasztották az RFLP és SSCP eredményeit.

A vizsgálati populációk genotípus gyakoriságának eloszlásában nem találtak statisztikailag szignifikáns eltérést ($p = 0,4$). A kontroll csoport adatait összevetve a tumoros esetekkel ($p = 0,37$) valamint a P3 populációval ($p = 0,5$) szintén nem tudtak statisztikailag szignifikáns különbséget kimutatni. Ugyancsak nem találtak statisztikailag jelentős eltérést a survivin promóter genotípus eloszlásokban a kontroll csoport és a HPV pozitív (P3 és méhnyakrákos) esetek ($p = 0,7$), illetve a tumoros és tumormentes (kontroll és P3) esetek ($p = 0,27$) között.

A cervix carcinomában leggyakrabban előforduló HPV típus a HPV 16, ezért az adataik elemzése során összevetették a HPV 16 pozitív P3 és méhnyakrákos populációk adatait a kontroll csoportéval. Ebben az esetben sem találtak szignifikáns különbséget a HPV 16 pozitív esetek és a kontroll minták genotípus eloszlásában ($p = 0,74$). A vizsgálati csoportjaikban kiszámolt allélgyakoriságok között nem volt statisztikailag értékelhető különbség ($p = 0,99$), az allélgyakoriság alapján kalkulált genotípus eloszlás megfelelt a Hardy-Weinberg egyensúlynak.

Megfigyeléseik azt feltételezik, hogy az általuk vizsgált populációban a survivin promóter polimorfizmus nem jelent kockázati tényezőt a cervix carcinoma kialakulása szempontjából.

Kimutatták, hogy a HPV16 E6 és E7 fehérjéje csökkenti a TGF- β 2 mRNS és biológiailag aktív fehérje szintjét primer keratinocitákban. Mivel a gátló mechanizmus részletesebb molekuláris hátterét nem vizsgálták, kotranszfekciós kísérleteket végeztek annak

tanulmányozására, hogy a virális onkogének hogyan hatnak a TGF- β 2 promóterére. A TGF- β 2 szekréciójának csökkentésében a p53, illetve a retinoblasztoma protein által mediált folyamatoknak is lehet szerepe, ezért kísérleteikhez 3 különböző sejtvonalat használtak. A C-33A kultúrában nincs jelen HPV szekvencia, de a sejtek a p53-at és a retinoblasztoma proteint is mutáns formában tartalmazzák. A HeLa sejtekben a p53 és az Rb a HPV18 genom jelenléte miatt funkcionálisan inaktív. A NIH/3T3 kultúra egér embrionális fibroblaszt eredetű, és biológiailag aktív p53 és retinoblasztoma fehérjét tartalmaz.

Első kísérleteikben a TGF- β 2 promóter 77, illetve 528 bp méretű darabját tartalmazó plazmid (pB2-77, pB2-528) transzkripció aktivitását vizsgálták a virális E6 és E7 jelenlétében. A C-33A sejtekben a HPV16 E6 és E7 fehérjeje kis mértékben aktiválta a TGF- β 2 promóterének mindkét darabját tartalmazó plazmidot. A HeLa kultúrában az E6 erős transzaktiváló hatást mutatott mind a rövidebb, mind a hosszabb promóter-darab esetében, míg az E7 fehérje csak a pB2-528 jelű plazmid transzkripció aktivitását emelte. A NIH/3T3 sejtekben a HPV16 E7 fehérjeje mérsékelten növelte a pB2-77 plazmid aktivitását, míg a pB2-528 aktivitását szignifikánsan (3-4-szeresen) gátolta. Abban az esetben, ha az E7 fehérjét kifejező expressziós plazmidot növekvő mennyiségben adtak kísérleti rendszerükhöz, már kis koncentráció esetén tapasztalták ezt a gátló hatást. Mivel az E7 csak nagyobb koncentrációban (2 μ g) növelte a pB2-77 transzkripció aktivitását, a promóter eme szakaszára kifejtett aktiváló hatása nem tűnik biológiailag szignifikánsnak.

Transzfekciós kísérleteik szerint az E7 gátló hatásáért felelős régió a TGF- β 2 promóterében a transzkripció kezdőhelyétől számított -528 és -251 bp között található. Kimutatták azt is, hogy ez a szakasz nem csak homológ, hanem heterológ (SV40) promóter elé klónozva is érzékeny az E7 represszálo hatására.

Kísérleteik alapján elmondhatják, hogy a HPV16 E7 TGF- β 2 promótert gátló hatásához szükséges az E7 és az Rb kapcsolódása. A p31Arg, p58Gly és p91Gly mutáns megőrizte represszálo hatását (bár itt a pB2-528 aktivitás nem volt olyan alacsony, mint a vad típusú E7 esetében), tehát a kazein kináz II foszforilációs hely és a Cys-X-X-Cys motívum nem játszik döntő szerepet a gátló hatás létrejöttében.

A HPV16 E7 fehérjeje a hypofoszforilált retinoblasztoma proteinhez kapcsolódva megakadályozza annak az E2F transzkripció faktorhoz való kötődését, a szabad E2F1 pedig számos, a sejtciklus S-fázisában közreműködő gén transzkripcióját befolyásolja. Kísérleteikben azt tapasztalták, hogy az E2F1 az E7 proteinhez hasonlóan gátolta a TGF- β 2 promóterének transzkripció aktivitását. Mindezekből az eredményekből azt a következtetést vonhatják le, hogy a HPV16 E7 fehérjeje valószínűleg az E2F1 Rb/E2F komplexből történő felszabadítása révén fejt ki gátló hatását a TGF- β 2 promóterére. Mivel a TGF- β 2 promóterében nem található konszenzus E2F-kötőhely, az E2F1 hatása indirekt lehet.

Munkájuk során megvizsgálták a TTV (human circovírus) és a HPV előfordulási arányát és a fertőzés eseteleges hatásait a gége tumoros megbetegedéseiben. Vizsgálataik legfontosabb eredményei a következők voltak: Az össz-TTV (1.-5. genocsoport) előfordulási gyakorisága nem különbözött szignifikánsan a vizsgálati csoportokban és jól korrelált az általuk korábban, egészséges véradók PBMC mintáiból kimutatható értékkel (95 %). Azon tumoros betegeknél, akiknél a műtét utáni időszakban komplikáció lépett föl – a tumor recidivált vagy metasztázis alakult ki -, szignifikánsan nagyobb volt az 1. genocsoportba tartozó TTV előfordulása, mint a többi vizsgálati csoportban. A gége laphámsejtes carcinomájában szenvedő betegek között szignifikánsan rosszabb volt a TTV-vel és HPV-vel egyaránt fertőzöttek komplikációmentes túlélése.

Feltételezik, hogy az 1. genocsoportba tartozó TTV és HPV eddig ismeretlen módon történő interakciója eredményezi a tumorprogressziót.

Eredményeik alapján ez a magyarázat a legvalószínűbb. A vizsgálati csoportok közül csak a tumorprogressziós carcinomás betegek esetében tapasztaltak kiemelkedően magas koinfekciós arányt. Szintén ezt a lehetőséget támasztja alá a malignus transzformáción átesett papillomatosisok esetében tapasztalt magas koinfekciós arány.

A feltételezett együttműködés hátterében számos folyamat állhat. A TTV-ről leírták, hogy immunmodulatív hatása lehet, így a TTV fertőzés lokálisan meggyengítve az immunválaszt, megakadályozhatja a HPV fertőzött sejtek eliminációját. A két vírus együttes jelenléte egyazon sejtben megváltoztathatja a sejtmetabolizmust, módosulhat a HPV integráció, megváltozhatnak az antigén-prezentáló útvonalak, megnőhet a proto-onkogének és/vagy a sejtvesztés anti-apoptotikus fehérjék expressziója.

Az E-cadherin tumorszuppresszor gén promoter –160 C/A polimorfizmusának szerepe a gyomor-, mell-, vastagbél- és prosztatadaganatokban jól ismert. A transzkripció kezdőhelyétől számított –160. bázisnál található, egyedi nukleotidot érintő (C/A) polimorfizmus megváltoztatja a promoter erősségét és a transzkripció faktorok kötődését, emellett közvetlen hatása van az E-cadherin gén transzkripciójára: az A allél kisebb transzkripciós aktivitással rendelkezik a C allélhoz viszonyítva. Ez az allélvariáció egy potenciális genetikai marker, melynek segítségével azonosíthatóak azok a betegek, akik megnövekedett kockázattal rendelkeznek az invazív / metasztatikus megbetegedésekre nézve.

A HPV a cervix carcinoma és a rekurrens respiratorikus papillomatosis (RRP) kialakulásában etiológiai faktor, míg a laryngealis carcinoma planocellulare kialakulásában kockázati tényezőként szerepel az alkoholfogyasztás és a dohányzás mellett.

Munkájuk során méhnyakrákos és laryngealis daganatokban (papilloma planocellulare és carcinoma planocellulare) vizsgálták a –160 C/A polimorfizmus előfordulását. Megvizsgálták az allélfrekvenciákat a humán papillomavírus fertőzés, illetve a metasztázis kialakulásával összefüggésben is.

Eredményeik szerint sem a cervix carcinomás primer daganatokban, sem a nyirokcsomó metasztázisaiban nem tért el szignifikánsan az allélfrekvencia a kontroll (egészséges véradó) populációhoz viszonyítva. A –160 C/A polimorfizmus megléte és a HPV jelenléte között sem talált összefüggést. A laryngealis carcinoma planocellulare mintákban a polimorfizmus előfordulása nem különbözött szignifikánsan a kontroll mintákhoz viszonyítva, és független volt a papillomavírus jelenlététől. A laryngealis papilloma planocellulare mintákban viszont szignifikánsan nagyobb volt a polimorf A allél frekvenciája, mint a kontroll populációban.

Rekurrens respiratory papillomavírus (RRP) esetekből HPV 11 DNS minden esetben kimutatható episzomális formában. A kópiaszám időről időre változott. Kéthetes cidofovir terápia hatására a vírus kópiaszám lecsökkent és a klinikai kép is jelentősen javult. A terápia folytatására azután ismét elérte a HPV genom kópiaszám a terápia előtti értéket, ismét fluktuált ez az érték és az RRP is megjelent. Így csak a terápia kezdetét tekinthetjük sikeresnek.

A HPV-6 pozitív, fej-nyaki, illetve cervixből származó minták esetében a malignus elváltozásokból a HPV-6 „b” variánsát detektálták, míg a benignus fej-nyaki és szájüregi mintákból HPV-6a volt kimutatható. A cervixből származó atípiás minták esetén HPV-6a-t vagy HPV-6b-t detektáltak. A HPV-6a és HPV-6b long control régióját (LCR), amelynek a virális gének expressziójának szabályozásában van szerepe, reporter vektorba klónozták annak tisztázására, hogy a két variáns LCR-ében is meglévő, irodalmi adatok alapján is megfigyelhető szekvencia különbségek befolyásolják-e a virális gének expressziójának

mértékét. A HPV-6a és 6b LCR-klónok már elkészültek, az expressziós vizsgálatok a közeljövőben veszik kezdetüket.

A cidofovir kezelésre rosszul reagáló, HPV-11 pozitív, juvenilis rekurrens respiratory papillomatosisban szenvedő beteg mintái közül a cidofovir terápiára még reagáló, illetve a kezelésre már nem reagáló szakaszból származó minták esetében is elvégezték a virális E1, E2, E6, E7 és long control regio SSCP analízisét, mely régióknak szerepe lehet abban, hogy a vírus a cidofovir kezelésre a terápia későbbi szakaszában rosszul reagált. Elvégezték továbbá az E2 és E7 régiók nukleotid szekvenálással történő szekvencia analízisét, az itt detektálható nukleotid szekvencia változások nem eredményeznek változást az E2 és E7 fehérjék aminosav sorrendjében. Jelenleg folyik a virális long control regio reporter vektorba történő klónozása, mivel a virális LCR különböző transzkripciós faktorok kötésével befolyásolhatja a virális gének transzkripciójának és expressziójának mértékét.